



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

« مدیریت پژوهشی »

گزارش نهایی طرح پژوهشی:

« بررسی تأثیر ضد لیشمانیایی عصاره جلبکهای

Cystoseira myrica، *Gracillaria corticata*، *Gracillaria selicornia*، *Caulerpa sertularioides*

و ترکیبات Curcumin در شرایط « Invitro »

مجریان طرح:

افشین برازش

دکتر مرادعلی فولادوند

همکاران طرح:

دکتر سعید تاج بخش

دکتر کیوان زندی

سال ۱۳۸۹

مقدمه نویسنده:

تجارب حاصله از این پروژه و پروژه های پیشین نشان می دهد که جهت سرعت بخشیدن به روند انجام کار و ارتقاء کیفیت نتایج، ضروری است که اعتبار مورد نیاز اجرای پروپوزال های مصوب شده در شورای پژوهشی به درستی دیده شده و به موقع نیز پرداخت گردد. هماهنگی های فیما بین دانشگاه و سایر ارگان های مرتبط با پروژه نیز از جمله مواردی است که میتواند موجب کندی روند کار پروژه شود که پیشنهاد میگردد با ارگان هایی که بیشترین ارتباط را در این خصوص دارند هماهنگی هایی از قبل صورت پذیرد و حتی میتوان تفاهم نامه هایی هم تنظیم و امضاء نمود.

تقدیر و تشکر:

نویسندگان، مراتب سپاس و تشکر خود را از مدیریت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر به خاطر تصویب و حمایت مالی از این طرح اعلام می دارند.

و با تشکر صمیمانه و قدردانی از:

- جناب آقای مهندس کهزاد سرطاوی که در تهیه جلبکهای مورد تحقیق و همچنین تعیین نام علمی آنها، از هیچ کوششی دریغ ننموده اند.
- جناب آقای دکتر خسرو محمدی که در تهیه ترکیبات فلزی کورکومین، نهایت همکاری را داشته اند.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول
۱	خلاصه گزارش
	فصل دوم
۲	مقدمه
۴	روش کار
۵	یافته ها
۱۲	بحث و نتیجه گیری
۱۸	پیشنهادهات
	فصل سوم
۱۹	منابع
۲۱	مقالات ارائه شده از طرح در سمینارها و کنگره ها
۲۲	مقالات ارائه شده از طرح در مجلات علمی

فهرست جداول ، اشکال و نمودار ها

صفحه

عنوان

-
- | | |
|----|--|
| ۶ | جدول شماره ۱ - درصد سیتوتوکسیته غلظتهای مختلف عصاره آب داغ جلبک |
| ۷ | جدول شماره ۲ - درصد سیتوتوکسیته غلظتهای مختلف عصاره آب سرد جلبک |
| ۸ | جدول شماره ۳ - درصد سیتوتوکسیته غلظتهای مختلف عصاره آب داغ جلبک |
| ۹ | جدول شماره ۴ - درصد سیتوتوکسیته غلظتهای مختلف عصاره آب سرد جلبک |
| ۱۰ | جدول شماره ۵ - درصد سیتوتوکسیته غلظتهای مختلف کورکومین خالص و |
| ۶ | نمودار شماره ۱ - تعیین Ic_{50} برای عصاره آب داغ جلبک <i>Caulerpa sertolarioides</i> |
| ۷ | نمودار شماره ۲ - تعیین Ic_{50} برای عصاره آب سرد جلبک <i>Caulerpa sertolarioides</i> |
| ۸ | نمودار شماره ۳ - تعیین Ic_{50} برای عصاره آب داغ جلبک <i>Gracilaria salicornia</i> |
| ۹ | نمودار شماره ۴ - تعیین Ic_{50} برای عصاره آب سرد جلبک <i>Gracilaria salicornia</i> |
| ۱۰ | نمودار شماره ۵ - تعیین Ic_{50} برای کورکومین خالص و ترکیب ایندیوم کورکومین |

خلاصه گزارش:

مقدمه: درمان لیشمانیوز جلدی هنوز بر پایه استفاده از ترکیبات آنتی موان ۵ ظرفیتی می باشد که عوارض جانبی زیادی برای بیماران به همراه دارد. مقاومت انگل نسبت به این داروها هم مسئله ای است که تلاش برای دستیابی به داروهای جدیدتر را بیش از پیش ضروری می نماید. در سالهای اخیر، تاثیر ضد ویروسی و ضد باکتریایی برخی از گونه های جلبک های بومی خلیج فارس بررسی و تأیید شده است. این مطالعه بمنظور تعیین اثر غلظتهای مختلف عصاره جلبک های مذکور و همچنین ترکیبات کورکومین بر روی پروماستیگوت های انگل لیشمانیا صورت پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، عصاره های آب سرد و آب داغ از جلبک های *Caulerpa sertularioides*، *Gracillaria selicornia*، *Gracillaria corticata*، *Cystoseira myrica*، موجود در خلیج فارس تهیه گردید و غلظتهای مختلف از این عصاره ها و همچنین ماده کورکومین به همراه ترکیباتی از آن شامل ایندیوم، گالیوم و دی استیل کورکومین، بصورت *Invitro* بر روی پروماستیگوت های لیشمانیای کشت داده شده در محیط RPMI-1640 اثر داده شده و نتایج با استفاده از روش *MTT assay* مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج: بر اساس این مطالعه، IC_{50} برای دو عصاره آب سرد و آب داغ جلبک کالریا سرتولاریوئیدس به ترتیب $85 \mu g/ml$ و $125 \mu g/ml$ ، برای دو عصاره آب سرد و آب داغ جلبک گراسیلاریا سالیکورنیا به ترتیب $46 \mu g/ml$ و $74 \mu g/ml$ و برای کورکومین و مشتق آن یعنی ایندیوم کورکومین به ترتیب $49/2 \mu g/ml$ و $11 \mu g/ml$ بدست آمد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که عصاره جلبک *Caulerpa sertularioides* و ترکیب ایندیوم کورکومین دارای اثرات مهار کنندگی قوی برای لیشمانیا بوده و لذا می توانند کاندید مناسبی برای مطالعات آینده در شرایط *Invivo* باشند.

کلمات کلیدی: ضد لیشمانیا، جلبک، خلیج فارس، مشتقات کورکومین

مقدمه

لیشمانیوز یکی از شایع ترین بیماریهای انگلی مشترک بین انسان و حیوان در مناطق گرمسیری است، بطوریکه در ۹۷ کشور جهان بصورت آندمیک وجود دارد و عامل آن تک یاخته ای از راسته کینتوپلاست داران بنام لیشمانیا می باشد.

در کل حدود ۳۵۰ میلیون نفر از افراد سرتاسر جهان در معرض خطر ابتلا به بیماری لیشمانیوز هستند و لیشمانیازیس پوستی رایج ترین نوع این بیماری بوده و ۵۷ درصد از تمامی موارد جدید توسط لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا بوجود می آید. در ایران اگر چه بیماری از مناطق سردسیر و شمال کشور نیز گزارش شده ولی کانونهای اصلی آن در استانهای جنوبی و غربی کشور است. موارد بیماری در پاره ای از نقاط جهان و از جمله ایران در سالهای اخیر افزایش قابل توجهی یافته است. این افزایش گرچه ممکن است تا حدودی مربوط به اطلاع بیشتر پزشکان و دسترسی آنها به آزمایشهای تشخیصی مطمئن تر باشد، ولی مسلماً ناشی از ازدیاد موارد بیماری نیز هست.

درمان لیشمانیوز بعنوان هفتمین اولوبت تحقیقاتی از طرف WHO مطرح شده است و علی رغم مطالعات زیادی که در این راستا صورت گرفته، هنوز درمان قطعی برای آن وجود ندارد و روز به روز شاهد شیوع بیشتر این بیماری هستیم. و از طرف دیگر درمان سیستمیک لیشمانیوز دارای عوارض و هزینه های خاص خود می باشد و باید این درمان برای موارد خاص در نظر گرفته شود.

درمان لیشمانیازیس پوستی در انسان هنوز بر پایه مصرف ترکیبهای آنتی موان ۵ ظرفیتی نظیر گلوکانتیم و پنتوستام است و آمفوتریسین B انتخاب دوم درمان می باشد. این ترکیبات بیشتر از یک قرن در درمان سالک سابقه مصرف دارند و مکانیسم اثر آنها از طریق تاثیر بر روی آنزیم های انگل و وقفه فعالیت آنزیم فسفوفروکتوکیناز و جلوگیری از تولید آدنوزین تری فسفات (ATP) می باشد که

علاوه بر عوارض کاربرد این ترکیبها، مقاومت انگل نسبت به آنها هم یک مشکل رو به تزاید است، طوری که هر ساله در جهان ۴۰۰ هزار مورد جدید گزارش می شود و عدم پاسخ دهی به گلوکانتیم رو به افزایش است. لذا تهیه داروی موثر و مطمئن و نیز عاری از عوارض جانبی، حائز اهمیت فراوان می باشد.

استفاده از داروهای گیاهی به دلیل عوارض و هزینه کمتر و سازگاری بیشتر بیماران به این داروها، در دهه های اخیر مورد توجه قرار گرفته است، بطوریکه ۲۵٪ کل داروهای موجود در آمریکا مشتق از گیاهان دارویی است. در این زمینه تاکنون مطالعات گسترده ای روی عصاره گیاهان و ترکیبات مختلف آن بر ضد انگل لیشمانیا صورت گرفته است. در منطقه استان بوشهر در سواحل خلیج فارس گونه ای از جلبکهای سبز دریایی بنامهای (*Gracillaria selicornia*, *Caulerpa sertularioides*, *Gracillaria* *Cystoseira myrica*, *corticata*) زیست می کنند که مطالعات اخیر بیانگر نقش ضد ویروسی و ضد باکتریایی آنها می باشد. با توجه به این مطلب و برای جستجوی یک ماده ضد لیشمانیایی موثر در درمان لیشمانیوز جلدی، در این پژوهش بر آن شدیم تا عصاره این جلبکها و همچنین برخی از ترکیبات کورکومین (*Curcumin*) (ماده زرد رنگ موجود در زرد چوبه (*Turmeric*)) که اخیرا از نظرخواص ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریال مورد توجه واقع شده است، را تهیه و میزان تاثیر آن را بر روی فرم پروماستیگوت انگل در شرایط آزمایشگاهی (*Invitro*) بررسی نماییم.

روش کار

نوع مطالعه از نوع *Invitro* می باشد. برای انجام این تحقیق، جلبکهای دریایی (*Caulerpa*، *Cystoseira myrica*، *Gracillaria corticata*، *Gracillaria selicornia*، *sertularioides*) از آبهای خلیج فارس منطقه بوشهر جمع آوری و پس از تایید نام علمی آن، در شرایط مطلوب خشک و بصورت پودر آماده گردید. پودر حاصله پس از عصاره گیری در غلظت مناسبی تنظیم شده و در حجم های کوچک منقسم تا زمان مصرف در دمای 5°C -۲۰- نگهداری شد.

در مرحله بعد، فرم پروماستیگوت انگل لیثمانیا ماژور سویه استاندارد، جهت جداسازی به محیط کشت NNN انتقال و در پاساژهای بعدی در محیط RPMI-1640 در دمای 25°C کشت داده شد و از پروماستیگوتهای در فاز ایستایی محیط کشت، سوسپانسیونی با غلظت مناسب تهیه و در برابر غلظتهای مختلفی از عصاره های مورد نظر و ترکیباتی از کورکومین همچون کورکومین، ایندیوم کورکومین، دی استیل کورکومین و غیره قرار گرفت. پس از انکوباسیون، تست سنجش رشد و تکثیر پروماستیگوتها در مقایسه با کنترلهای مثبت و منفی، با استفاده از تکنیک MTT(Methyl tetrazolium tiazole) انجام شد.

نتایج حاصله به کمک نسخه ۱۷ نرم افزار آماری (Chicago, IL Inc. SPSS) و آزمون کروسکال والیس، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها

نتیجه عمل کشت انگل در محیط کشت RPMI1640 و وضعیت رشد تکثیرشان پس از رسیدن به فاز ایستایی رشد که هر روز در زیر میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار می گرفت، با استفاده از لام نئوبار صورت پذیرفت و تعداد پروماستیگوت ها پس از شمارش، طبق فرمول ml / تعداد انگل = میانگین تعداد انگل در ۱۶ مربع کوچک (ضریب رقت) $10^4 \times 10$ تنظیم گردید و در هر باری که آزمایش برای یکی از عصاره ها انجام می گرفت، نتیجه عمل کشت به همان ترتیب گفته شده، ارزیابی شده و بالام نئوبار تعداد آنها مشخص می شد و میزان 250λ از سوسپانسیون حاصله درون حاپک های میکروپلیت کوت می گردید. برای تفسیر نتایج تست MTT assay و تعیین درصد رشد انگل ها پس از مواجهه با عصاره های مورد مطالعه، از فرمول $(\% viability = \frac{OD_{TEST} - OD_{BLANK}}{OD_{negative control} - OD_{blank}} \times 100)$ برای هر رقت از هر کدام از عصاره ها به طور جداگانه استفاده گردید و سپس درصد سیتوتوکسیته هر کدام از تست ها، طبق فرمول: $\% cytotoxicity = 100 - \% viability$ محاسبه شد و منحنی های مربوطه برای محاسبه IC_{50} هر عصاره (غلظتی از عصاره که می تواند ۵۰٪ از انگل را از بین برد) رسم گردید. برای رسم این منحنی، در یک ضلع آن غلظت های عصاره و در ضلع دیگرش، درصد بازدارندگی (سیتوتوکسیته) که طریقه محاسبه آن ذکر گردید، قید می شود.

تعیین IC_{50} برای عصاره آب داغ جلبک *Caulerpa sertolarioides*

نتایج هر کدام از غلظت های عصاره آب داغ جلبک کالریا سرتولاریوئیدس که بصورت دو بلیک انجام گردیده بود، جداگانه محاسبه و بصورت میانگین در جدول زیر آورده شد.